

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné a vývojové biologie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Stres endoplazmatického retikula a indukce apoptózy **u nádorových buněk**

Endoplasmic reticulum stress and apoptosis induction in tumor cells

Jana Žůrková

Školitelka: PharmDr. Jana Vobořilová, PhD.

Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK

Praha 2010

Poděkování

Ráda bych poděkovala svojí školitelce PharmDr. Janě Vobořilové, PhD. za trpělivost a vstřícnost při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě ve studiu vždy podporovala.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně z uvedené literatury a na základě konzultací se svojí školitelkou, PharmDr. Janou Vobořilovou, PhD.

Praha 2010

Jana Žůrková

Abstrakt

Stres endoplazmatického retikula (ER) je způsoben hromaděním chybně sbalených proteinů v ER. Může být vyvolán nepříznivými vnějšími podmínkami jako je hypoxie nebo nedostatek živin a energie. Stresový stav se buňka snaží vyrovnat obranným mechanismem zvaným UPR (unfolded protein response). Snižuje produkci nových proteinů, zvyšuje expresi chaperonů a snaží se rychleji odbourávat chybně sbalené proteiny. Pokud však stres přetrvává nebo je moc silný, buňka přepne z UPR na apoptotickou dráhu. Apoptóza spuštěná přes stres ER je zprostředkována vnitřní mitochondriální dráhou, účastní se jí proteiny rodiny Bcl-2 a jsou aktivovány specifické kaspázy.

Nádorové buňky jsou nepříznivým podmínkám vystaveny častěji než buňky normální. Je to způsobeno hlavně jejich rychlým růstem, při kterém se často nestačí vytvořit dostatečné cévní zásobení. Buňky se vyskytují v hypoxickém prostředí, trpí nedostatkem glukózy a dalších živin. Proto je u nádorových buněk častěji spuštěn UPR. To je odlišuje od buněk normálních. Zaměřením léčby na komponenty UPR nabízí možnost specificky zasáhnout pouze nádory a zachovat zdravé tkáně. Stres ER můžeme například prohloubit blokováním proteasomů či inhibicí chaperonů. Tím se zvýší pravděpodobnost, že buňka stres již nezvládne vyrovnávat a spustí apoptózu. Dále je možné přímo zablokovat určitou molekulu signální dráhy UPR. Možné strategie indukce apoptózy vyvolané stresem ER jsou nastíněny v této práci.

Klíčová slova: apoptóza, ER stres, UPR, nádorové buňky, protinádorová léčba

Abstract (english)

Endoplasmic reticulum stress is caused by accumulation of misfolded proteins in ER. It can be induced by external conditions like hypoxia, hypoglycemia, and lack of amino acids or other nutrients. Cells have a special mechanism to balance these conditions and restore homeostasis. This mechanism is called unfolded protein response (UPR). UPR provides downregulation of proteosynthesis, upregulation of chaperone expression and fast degradation of misfolded proteins. In case of long lasting or strong ER stress, cells may not be able to sustain these conditions and they switch from UPR to apoptotic pathways. ER stress-induced apoptosis is mediated by intrinsic mitochondrial pathway. It includes Bcl-2 protein family and specific caspases activation.

Tumor cells are exposed to stress situations more often, compared to normal cells. It is caused by their quick growth, during which the vascularization is not sufficient. Thereby in tumor cells UPR is activated more frequently. This fact differentiates tumor cells from normal cells and provides specific place, where they can be attacked. There are several possibilities how we can attack them. For example ER stress can be intensified by inhibiting proteasomes or chaperones. Also some molecules of UPR pathway can be blocked. This leads to triggering apoptosis. In this work there are shown some strategies against tumor cells employing UPR and ER stress-mediated apoptosis.

Keywords: apoptosis, ER stress, UPR, tumor cells, anticancer therapy

Seznam použitých zkratek

4E-BP 1	4E-binding protein 1
17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
AIF	apoptosis inducing factor
Anti-FasmAb	anti-Fas monoclonal antibody
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor 1
ARF	ADP ribosylation factor
ASK 1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF 4	activating transcription factor 4
ATF 6	activating transcription factor 6
BI-1	BAX inhibitor 1
BiP/GRP78	binding protein/glucose regulated protein 78 – Hsc3
BFA	brefeldin A
BH	Bcl-2 homology
CHOP	CCAAT/enhancer binding protein homologous transcription factor
CLL	chronická lymfocytární leukémie
DD	death domain
DEDs	death effector domains
DISC	death inducing signaling complex
Drp1	dynamain related protein 1
EGCG	epigallocatechin gallate
eIF2 α	α -subunit of eukaryotic initiation factor-2
EOR	ER-overload response
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	ER associated degradation
FADD	Fas-associated protein with death domain
GA	geldanamycin
GADD	growth arrest and DNA damage-inducible protein
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
IAP	inhibitor of apoptosis
IRE1	inositol-requiring enzyme 1

JNK	c-jun N-terminal kinase
Mfn	mitofusin
MPA-7/IL-24	melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24
mPEG-b-PCC	methoxy-cappedpoly(ethyleneglycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) micelles)
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
PEO-b-PDLLA	poly(ethylene oxide)-b-poly(D,Llactide)
PERK	pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase
PTP	permeability transition pore
ROS	reactive oxygen species
subAb	AB ₅ subtilázový cytotoxin
TC-A	tetrocarcin A
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAF 2	TNF receptor-associated factor 2
UPR	unfolded protein response
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 APOPTÓZA.....	9
3 STRES ENDOPLASMATICKÉHO RETIKULA.....	13
3.1 ER STRES A UPR.....	13
3.2 HLAVNÍ MOLEKULY UPR.....	14
3.2.1 IRE1.....	14
3.2.2 ATF6.....	14
3.2.3 PERK.....	15
3.3 NÁSLEDKY ER STRESU.....	15
4 ER STRES A APOPTÓZA.....	16
4.1 PROTEINY RODINY BCL-2.....	16
4.2 SPECIFICKÉ KASPÁZY.....	18
5 FYZIOLOGIE NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	19
6 ER STRES A NÁDOROVÉ BUŇKY.....	20
6.1 HLAVNÍ MOLEKULY UPR V KONTEXTU NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	21
6.1.1 BiP/GRP78	21
6.1.2 IRE1/XBP1	22
6.1.3 PERK.....	22
7 ER STRES A JEHO VYUŽITÍ PŘI NÁDOROVÉ LÉČBĚ.....	23
7.1 LÁTKY VYVOLÁVAJÍCÍ ER STRES.....	23
7.1.1 Inhibitory proteasomu 26S.....	23
7.1.2 Inhibitory chaperonu HSP90.....	25
7.1.3 Brefeldin A.....	26
7.1.4 Tetrocarcin-A.....	27
7.1.5 Ritonavir a nelfinavir.....	27
7.1.6 Kurkumin.....	28
7.2 INHIBITORY ER STRESOVÉ ODPOVĚDI.....	29
7.2.1 Inhibitory BiP/GRP78.....	29
8 ZÁVĚR.....	31
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32

1 Úvod

Léčba nádorových onemocnění je i přes neustálý výzkum na tomto poli aktuálním problémem současné medicíny. Nádory se vyskytují u stále mladších osob a jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí u nás i ve světě. Nevýhodou protinádorové léčby chemoterapeutiky je fakt, že není zcela zacílena na buňky nádorové a jsou postiženy i buňky zdravé. Léčba je provázena značnými vedlejšími účinky, které často nedovolí zcela ji dokončit. Proto je zde velká snaha vyvinout léky cílenější, šetrnější a účinnější.

V tomto směru jsou intenzivně studována léčiva využívající stresu endoplazmatického retikula (ER). Stres endoplazmatického retikula nastává, když se buňka vyskytuje v nepříznivých podmínkách, a projevuje se hromaděním nesbalených proteinů v ER. Po tom, co je stres zaregistrován senzory v ER, se spustí dráha, která se snaží znovu nastolit rovnováhu. ER stres ale může v případě dlouhotrvajícího nedostatku živin a kyslíku buňku dovést až k apoptóze. Nádorové buňky se v důsledku rychlého růstu často vyskytují v prostředí s nedostatečnou vaskularizací a jsou vystaveny stresu častěji než buňky zdravé. Toho může využít protinádorová léčba ke snazšímu a cílenějšímu vyvolání apoptózy, například prohloubením ER stresu či blokováním reakcí obrany proti ER stresu.

Studium spojení ER stresu a apoptózy u nádorových buněk je poměrně novým odvětvím a s jeho využitím by bylo možné výrazně změnit přístup k protinádorové terapii, hlavně díky velké výhodě, kterou je zacílení přímo na nádorové buňky.

2 Apoptóza

Termín apoptóza navrhnul v roce 1972 JF Kerr pro proces sebevražděného programovaného odumírání buněk. Apoptóza je aktivní proces nastávající za fyziologických podmínek. Pomocí apoptózy organismus udržuje homeostázu, odstraňuje poškozené, nepotřebné či napadené buňky a je důležitá i pro fungování imunitního systému či embryogenezi. Pokud je dysregulována, nastávají různé patologické stavy jako jsou neurodegenerativní onemocnění, autoimunitní onemocnění či nádorové bujení.

Narozdíl od nekrózy, která probíhá pasivně, probíhá apoptóza aktivně za spotřeby energie a buňka při ní prodělává charakteristické morfologické změny (Hacker, 2000). Dochází ke zhušťování cytoplazmy a scvrkávání buňky, jaderný chromatin kondenzuje a DNA je fragmentována. Naproti tomu orgány a plazmatická membrána zůstávají neporušeny. Plazmatická membrána se ztlušťuje a vytváří výběžky. RNA a proteiny přestávají být syntetizovány a jsou postupně degradovány. Buňka se rozpadá do váčků, neboli apoptotických tělísek (Kerr et al., 1972), naplněných cytoplazmou a případně fragmenty DNA. Tato tělíska jsou potom pohlcena makrofágy. Při apoptóze tedy není vyvolána zánětlivá reakce, jako je tomu při nekróze, kdy je obsah buňky vyplaven do extracelulárního prostoru a jsou produkovány zánětlivé cytokiny. Nedochází ani k vylití obsahu buňky a tělíska jsou rychle fagocytována (Savill a Fadok, 2000).

Buňky obsahují genetickou výbavu pro spuštění apoptózy celý život a program se spustí po obdržení signálu. Jsou známy tři hlavní dráhy vedoucí ke spuštění apoptózy. První dráha vede přes tzv. receptory smrti (Ashkenazi, 2002; Strasser et al., 2000) a je nazývána vnější dráhou. Druhá je vnitřní mitochondriální dráha, která je zřejmě původnější a je vyvolána stresem v buňce, například poškozením DNA či nepřiměřenou hladinou cytokinů. Další možnou dráhou spuštění apoptózy je granzym/perforinová. Je využívána hlavně cytotoxickými lymfocyty a NK buňkami pro odstraňování infikovaných nebo abnormálních buněk.

Klíčová v zahájení procesu apoptózy je rodina cysteinových proteáz – kaspáz. Kaspázy vznikají jako inaktivní prekurzory – prokaspázy, jejichž aktivace spouští proteolytickou kaskádu vedoucí k zesílení signální dráhy a rychlé buněčné smrti. Kaspázy dělíme na iniciační, exekuční a zánětlivé. Iniciační kaspázy aktivují exekuční kaspázy a ty potom štěpí substráty smrti, jako jsou cytoskeletární proteiny, DNAsy, regulační proteiny či proteiny zajišťující opravy DNA.

Vnější signální dráha je aktivována interakcí transmembránového receptoru a substrátu smrti. Jedná se o receptory z rodiny TNF (tumor necrosis factor) (Locksley, 2001). Do rodiny TNF receptorů (TNFR) patří například TNFR, TRAIL receptor, Fas/Apo-1/CD95 a CD40. Tyto receptory mají na extracelulární straně cystein-bohatou doménu smrti (Ashkenazi a Dixit, 1998), zajišťující specifitu ligandu. Na cytosolické straně je death domain (DD) motiv.

TNF interaguje s receptorem TNF-R1. Je vytvořen komplex, ve kterém adaptorová molekula TRADD interaguje s další adaptorovou molekulou FADD pomocí interakcí jejich death domén. Následně je přivedena prokaspáza 8 a 10, která asociuje s FADD skrz death efektorové domény (DEDs). Tento komplex vyvolá konformační změny a aktivaci kaspáz (Micheau a Tschopp, 2003).

Vazba Fas ligandu na Fas receptor způsobí navázání adaptorového proteinu FADD interakcí jejich death domén. FADD posléze asociuje s prokaspázou 8 skrz DEDs. Formuje se tzv. death inducing signaling complex (DISC) a prokaspáza 8 je aktivována konformačními změnami (Kischkel et al., 1995). Poté je z DISC uvolněna.

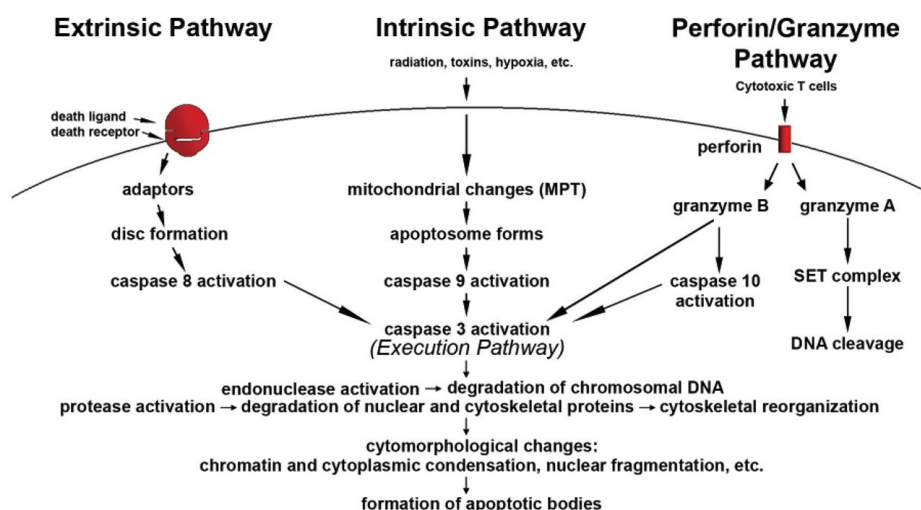
Vnitřní dráha indukce apoptózy je spojena s mitochondriemi. Výraznou roli v této dráze hrají proteiny rodiny Bcl-2. Dělíme je do 3 skupin podle obsahu Bcl-2 homologních domén (BH) a funkce.

Podrodina Bcl-2:	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, Boo (BH1 až BH4) Antiapoptotické proteiny, obsahují na doménách BH1-BH3 hydrofobní žlábků pro interakci s proapoptotickými proteiny
Podrodina Bax:	Bax, Bak, Bad, Mtd, Diva (BH1 až BH3, nemají BH4) Proapoptotické proteiny Také formují hydrofobní žlábků na BH1-BH3 (Vieira a Kroemer, 1999)
Podrodina BH3:	Bik, Bid, Bim, Hrk, Blk, Bnip3, Bnip3L (pouze BH3 doména) Proapoptotické proteiny Jejich BH3 doména se váže do hydrofobního kanálku antiapoptotických proteinů (Kuwana et al., 2002)

O tom, jestli se spustí apoptóza rozhoduje poměr pro a antiapoptotických proteinů. Pokud převládá apoptóza, proapoptotický protein Bax se přemístí do vnější mitochondriální membrány. S ním se v membráně nachází i Bak protein a společně ovlivňují propustnost vnější mitochondriální membrány. Z mitochondrií se uvolní proapoptotické molekuly –

cytochrom c (Liu et al., 1996), Smac/Diablo (protein aktivující kaspázy a blokující IAP – inhibitor apoptózy) (Du et al., 2000), AIF (apoptotic inducing factor) (Snow et al., 1999), endonukleáza G (Li et al., 2001).

Cytochrom c v cytoplasmě interaguje s proteinem Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1), dATP či ATP a vytváří komplex aktivující kaspázy, tzv. apoptosom (Cain et al., 2002). Tento komplex aktivuje prokaspázu 9. Po uvolnění kaspázy 9 z apoptosomu je štěpena a aktivována prokaspáza 3 (Rodríguez a Lazebnik, 1999). Smac/Diablo se váže na inhibitor apoptózy IAP (inhibitor of apoptosis) a tím zesiluje nástup apoptózy. AIF se po obdržení apoptotického signálu přesouvá z cytoplazmy do jádra a způsobuje kondenzaci DNA a její fragmentaci.



Obr. 1: Schéma signálních drah vedoucích ke spuštění apoptózy

(Převzato z Elmore, 2007)

Vnější, vnitřní a perforin/granzymová dráha – sled dějů vedoucí k aktivaci exekučních kaspáz.

Mitochondrie mají důležitou roli v řízení apoptózy pomocí Ca^{2+} (McBride et al., 2006). Při zvýšeném množství Ca^{2+} v mitochondriální matrix se otevírá permeability transition pore (PTP) ve vnitřní mitochondriální membráně. Mitochondriální matrix bobtná a vnější mitochondriální membrána praskne za uvolnění cytochromu c (Zamzami a Kroemer, 2001). Mitochondrie jsou ve spojení s endoplasmatickým retikulem (ER) (Hajnóczky et al., 2006). Při nahromadění špatně sbalených proteinů nebo narušení transportní dráhy ER-Golgi v důsledku stresu může ER indukovat apoptózu (Oakes et al., 2003). Po stimulaci ER 1,4,5-trifosfátem (IP3) je uvolněn Ca^{2+} a přijímán mitochondriemi (Rizzuto et al., 1993).

Na povrchu ER je umístěn proapoptotický protein Bik, který vyvolává odvod Drp1 (dynamin related protein 1) k mitochondriím (Germain et al., 2005). Drp1 je jeden z proteinů způsobující remodelaci mitochondrií během apoptózy.

Při poškození DNA buňky, například chemickými látkami nebo radiací, je aktivována molekula p53, která napomáhá opravování DNA. Pokud je poškození nevratné, indukuje apoptózu (Pietenpol a Stewart, 2002).

3 Stres endoplasmatického retikula

3.1 ER stres a UPR

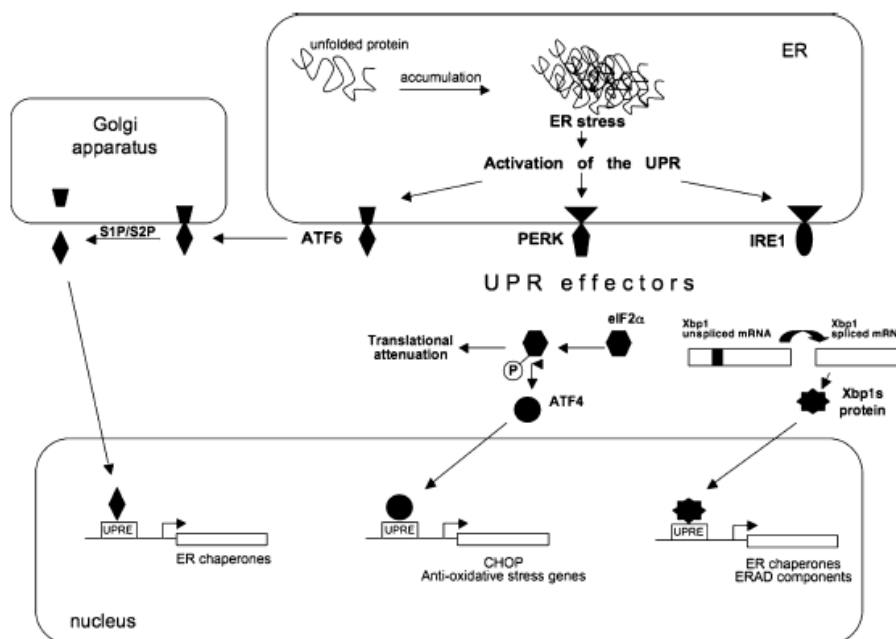
Endoplazmatické retikulum (ER) je zodpovědné za syntézu, modifikaci a doručení sekretorických a membránových proteinů do cílových míst. Proteiny zde zaujímají svoji nativní konformaci za pomoci chaperonů. Probíhají zde posttranslační modifikace jako je glykosylace a tvorba disulfidických můstků. Proteiny jsou kontrolovány v procesu nazývaném quality-control. Správně sbalené proteiny jsou exportovány do Golgi, zatímco nesprávně sbalené jsou zadrženy v ER. Jsou buď znova baleny nebo označeny k degradaci (Ellgaard et al., 1999). Stres ER je způsoben hlavně hromaděním špatně sbalených proteinů. Buňka reaguje mechanismem známým jako unfolded protein response (UPR) (Kozutsumi et al., 1988). ER stres nastává např. při nedostatku glukózy, ischemii, mutacích v genech kódující sekretorické nebo transmembránové proteiny nebo infekci některými patogeny (hepatitis C). UPR lze indukovat inhibicí glykosylace, vyčerpáním zásob Ca^{2+} nebo expresí mutantních sekretorických či transmembránových proteinů (Kaufman, 2002). Jsou známy tři transmembránové proteiny fungující jako senzory ER stresu.

Je to PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) a IRE1 (inositol-requiring enzyme 1). Jejich doména v lumen ER registruje ER stres způsobený akumulací nesbalených proteinů, zatímco jejich cytosolická doména aktivuje signální efekторы. Aktivace UPR vede ke snížení translace a ke zvýšené transkripci genů kódujících chaperony a komponenty ER Associated Degradation (ERAD). ERAD je proteolytická dráha, ve které jsou nesbalené proteiny z ER aktivně přenášeny do cytoplazmy a označeny ubiquitinem pro degradaci ve 26S proteasomu (Jarosch E. et al., 2003). Další dráhou odpovědi na stres ER je EOR (ER-overload response).

3.2 Hlavní molekuly UPR

3.2.1 IRE1

IRE1 je transmembránový protein se dvěma hlavními doménami. Dimerizační doménou v lumen ER a cytosolickou doménou, která má protein-kinázovou a endonukleázovou aktivitu. Není zcela jasné, jak registruje nesbalené proteiny v ER. Stres spouští oligomerizaci IRE1 a jeho endonukleázovou aktivitu. IRE1 potom štěpí mRNA kódující doménu transkripčního faktoru Hac1 v kvasinkách nebo Xbp1 u mnohobuněčných organismů. Z Hac1 vyštěpí intron, exony jsou spojeny ligázou (Sidrauski et al., 1996) a tímto vyštěpením se posune čtecí rámec. Z této mRNA může být přepisován Hac1 (Rueggsegger et al., 2001). Stejně tak je vyštěpen i intron Xbp1 u kvasinek a tím je transkripční faktor aktivován. Hac1 a Xbp1 aktivují transkripci například chaperonů a ERAD faktorů.



Obr. 2: Senzory ER stresu a dráhy UPR

(Převzato z Rasheva a Domingos, 2009)

Odpověď na ER stres zahrnuje tři hlavní dráhy, které jsou aktivovány různými senzory:

ATF6, PERK a IRE1.

3.2.2 ATF6

ATF6 v normálních buňkách je udržován v lumen ER pomocí interakcí s Ca^{2+} vazebným chaperonem BiP/GRP78 (binding protein/ glucose regulated protein 78 – Hsc3) (Shen et al., 2002). Při stresu je ATF6 transportován do Golgi a tam je štěpen proteázami, čímž je uvolněna jeho cytosolická doména. Ta putuje do jádra a aktivuje transkripci genů pro

chaperony (Ye et al., 2000). GRP78 interaguje také s IRE1 a PERK. Jeden z přijatelných modelů aktivace UPR je takový, že při vysoké koncentraci GRP78 v lumen ER asociují domény ATF6, PERK a IRE1 častěji s GRP78, než se sebou navzájem. Při výskytu většího množství nesbalených proteinů by pak GRP78 přednostně vázal tyto nesbalené proteiny, namísto ATF6, PERK a IRE1. IRE1 a PERK by se uvolnily pro homodimerizaci a autofosforylaci, ATF6 pro odvod do Golgi a štěpení.

3.2.3 PERK

PERK je transmembránový protein s cytosolickou doménou, která má kinázovou aktivitu. Aktivovaná cytosolická doména dimerizuje, autofosforyluje se a způsobuje fosforylaci transkripčního faktoru eIF2 α (α -subunit of eukaryotic initiation factor-2) (Shi et al., 1998). Tím je tento transkripční faktor inhibován. S menším množstvím eIF2 α se sníží i množství nově syntetizovaných proteinů, které by bylo potřeba zabalit (Harding et al., 1999). Fosforylace eIF2 α vede ke zvýšené translaci specifických mRNA, například transkripčního faktoru ATF4 (Vattem a Wek, 2004). Deaktivace PERK je způsobena kochaperonem, který je v pozdní fázi UPR vytvářen ve zvýšeném množství pomocí ATF6. Kochaperon inhibuje aktivitu PERK vazbou na kinázovou doménu (Yan et al., 2002). Probíhá také defosforylace a aktivace eIF2 α (Novoa et al., 2003).

3.3 *Následky ER stresu*

Jako následek ER stresu mají buňky výrazně pozměněný metabolismus, hlavně metabolismus glukózy. Přecházejí na anaerobní glykolýzu, která však oproti aerobnímu metabolismu generuje pouze 2 molekuly ATP na molekulu glukózy (Pan a Mak, 2007; Gillies a Gatenby, 2007). Přechod nádorových buněk na glykolýzu se nazývá Warburgův efekt a byl popsán ve 20. letech minulého století. Jedním z následků glykolýzy je okyselení mikroprostředí okolo buněk v důsledku tvorby laktátu a jeho pumpování ven z buňky.

Následky ER stresu mohou být různé. Buňka buď přežije a adaptuje se, zahájí apoptózu nebo přejde do senescence. Nádorové buňky často dlouho odolávají stresu a přežívají.

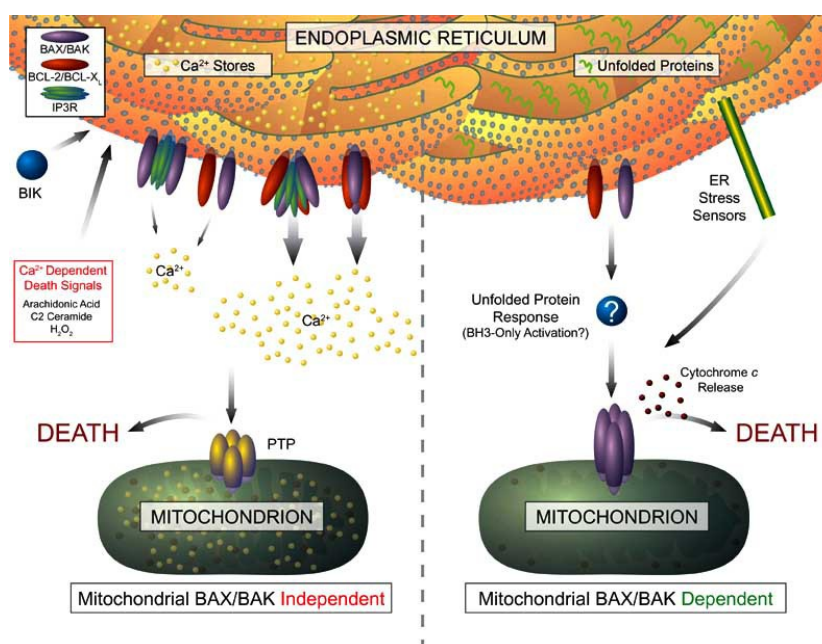
4 ER stres a apoptóza

Neustálý ER stres za hranice možností adaptace může vyústit v apoptózu. Odumírání buněk a tkání v důsledku nadměrného stresu ER je příčinou mnoha onemocnění. ER komunikuje s mitochondriemi a apoptóza vyvolaná stresem ER je zprostředkována přes vnitřní mitochondriální dráhu.

4.1 Proteiny rodiny Bcl-2

Proteiny rodiny Bcl-2, jako například Bcl-2, Bik, Bax, Bak se vyskytují nejen v mitochondriích, ale i v ER, a hrají regulační roli v komunikaci ER-mitochondrie při spouštění apoptózy (Häcki et al., 2000; Galonek a Hardwick, 2006; Oakes et al., 2006).

Apoptóza je inhibována expresí Bcl-2 (Srivastava et al., 1999; Guo et al., 1998; Scorrano, 2003).



Obr. 3: Apoptotické dráhy nezávislé a závislé na přítomnosti Bax/Bak na mitochondriích

(Převzato z Oakes et al., 2006)

Indukce apoptózy je závislá na aktivaci Bax a Bak na mitochondriích. Jsou známy dvě modelové dráhy spuštění apoptózy. V první je vypuštěn Ca^{2+} z ER, například na základě oxidačního stresu nebo signalizaci lipidových intermediátů. Dochází k aktivaci mitochondriálního PTP a narušení mitochondriální membrány. Vápníkové ionty jsou

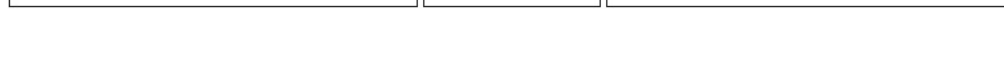
přijímány mitochondriemi a je zahájena apoptóza. Tato dráha je řízena Bcl-2 rodinou na ER (Scorrano et al., 2001; Herrmann et al., 1997; Zhang et al., 1996) a je nezávislá na přítomnosti Bax/Bak na mitochondriích.

Druhá dráha je spuštěna potom, co ER stresový senzor zaznamená přítomnost nesbalených proteinů v lumen ER. Signalizace probíhá bez Ca^{2+} a vyžaduje přítomnost Bax/Bak i na mitochondriích (Scorrano et al., 2003). Z mitochondrií se vylije cytochrom c a nastává apoptóza.

Pokud buňka již nezvládne bojovat se stresem, přepne se UPR signalizace na proapoptotickou, závislou na přítomnosti Bax/Bak na mitochondriích. Zahájení apoptózy se může dít skrz IRE1, PERK a ATF6. Tyto molekuly nezpůsobují apoptózu přímo, ale aktivují další molekuly, které nasměrují buňku do spuštění smrtelné dráhy. Jednou z těchto molekul je CHOP (CCAAT/enhancer binding protein homologous transcription factor). Během ER stresu je transkripce CHOP indukována IRE1, PERK i ATF6.

CHOP ovlivňuje expresi genů jako je BCL-2 a GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein). GADD34 způsobuje defosforylaci a aktivaci eIF2 α , čímž zvyšuje proteosyntézu a navozuje apoptózu (Brush et al., 2003). Zabráněním defosforylace eIF2 α je naopak snížena apoptóza vyvolaná ER stresem (Boyce et al., 2005; Marciniak et al., 2004). Není přesně známo, jak je apoptóza navozena. Jednou z možností je, že obnovení syntézy v ER umožní i syntézu proapoptotických proteinů. CHOP potlačuje expresi BCL-2 genu a tím zvyšuje množství proapoptotických proteinů v buňce.

UPR dráhou IRE1-TRAF2-ASK1 je aktivována kináza JNK (c-Jun N-terminal kinase). IRE1 oligomerizuje v komplexu obsahující TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), což vede k aktivaci kinázy ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) a následně kinázy JNK. JNK stejně jako CHOP brání antiapoptotickému efektu Bcl-2. JNK reguluje Bcl-2 proteiny pomocí fosforylace. Fosforylovaný Bcl-2 na ER nemůže blokovat proapoptotické proteiny a regulovat tok Ca^{2+} (Bassik et al., 2004). JNK fosforyluje a aktivuje proapoptotické proteiny jako je PUMA, Noxa a Bim, které také hrají roli v ER stresu. Bim je v normálním stavu inaktivován vazbou na dynein. Poté, co je aktivován pomocí JNK, se může Bim uvolnit a fungovat ve prospěch apoptózy (Lei a Davis, 2003). Celkově tedy tyto dráhy umožní aktivaci Bax/Bak, které zajistí vyliší cytochromu c, Smac/Diablo, AIF a Endo G z mitochondrií.



(Převzato z Szegezdi et al., 2006)

reakcí s Bcl-2 na mitochondriích i ER

obdržení stresového signálu jsou aktivovány CHOP a JNK. Obě molekuly inaktivují Bcl-2. CHOP blokováním exprese a JNK jeho fosforylací. JNK také fosforyluje Bim a tím ho aktivuje. Bax/Bak je aktivován a může dojít k rozšíření apoptotické kaskády na mitochondrie.

Děje uvedené v předchozí kapitole vedou k aktivaci kaspáz. Zatím nevíme, které všechny kaspázy se účastní, ale dosud byla pozorována účast kaspáz 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 a 12. Kaspáza 12 se zdá být hlavním mediátorem apoptózy zprostředkované ER stresem (Nakagawa a Yuan, 2000). Účast kaspázy 12 byla ale zjištěna jen u hlodavců, ne u člověka (Fischer et al., 2002).

Myší kaspáza 12 se vyskytuje na cytosolické straně ER. Je syntetizována jako prokaspáza a má regulační a katalytické domény. Je aktivována pouze při smrtelných signálech vycházejících ze stresu ER. Bylo navrženo několik způsobů, jak je kaspáza štěpena a aktivována. M-calpain, Ca^{2+} -dependentní cysteinová proteáza, štěpí a aktivuje prokaspázu 12 na N-terminálním konci. Calpain by mohl být aktivován Ca^{2+} uvolněným z poškozeného

ER (Nakagawa a Yuan, 2000). V některých buňkách se kaspáza 7 přemístí z cytosolu na ER membránu a štěpí kaspázu 12 v odpověď na ER stres (Rao et al., 2002). Aktivace je závislá na Bax/Bak. UPR vede k aktivaci kaspázy 12 pouze v přítomnosti Bax/Bak (Zong et al., 2003; Ruiz-Vela et al., 2005). Sekvence lidského genomu, která je vysoce homologní s myší kaspázou 12, obsahuje přerušení předčasným stop kodonem, posun čtecího rámce a substituce v místě kritickém pro aktivitu kaspázy (Fischer et al., 2002).

Podobné chování jako kaspáza 12 má ale lidská kaspáza 4 a předpokládá se, že funguje v ER-zprostředkované buněčné smrti podobně jako kaspáza 12. Kaspáza 4 je lokalizovaná přednostně na ER a kromě toho i na mitochondriích. Je specificky aktivovaná pouze apoptotickými signály indukujícími ER stres, ne těmi, které ho nezpůsobují (Hitomi et al., 2004).

Kromě Bcl-2 rodiny se membráně ER vyskytuje také rodina proteinů BI-1 (BAX inhibitor 1), které mají antiapoptotický efekt (Xu a Reed, 1998). Při nadměrné expresi má BI-1 cytoprotektivní funkci, naopak absence BI-1 vede ke zvýšené citlivosti k ER vyvolané apoptóze. BI-1 chrání před apoptózou vyvolanou ER stresem, klasické dráhy apoptózy nejsou ovlivněny. BI-1 snižuje sestřih a aktivaci kaspáz, aktivaci Bax, depolarizaci mitochondriální membrány a změny v morfologii mitochondrií po působení ER stresu. BI-1 také hraje roli v regulaci ER Ca^{2+} (Chae et al., 2004).

5 Fyziologie nádorových buněk

Pro pochopení významu UPR pro nádorové buňky je nutné si uvědomit, jaké jsou jejich vlastnosti, specifické rysy a v jakých podmínkách se vyskytují.

Nádorové buňky jsou charakteristické rychlým růstem. Původní cévní síť je ale často nedostatečná pro rostoucí tkáň. V důsledku nedostatečného prokrvení buňky dostávají málo živin jako je glukóza nebo aminokyseliny a dochází k hypoxii. Nedostatek glukózy ovlivňuje glykosylaci sekretorických proteinů v ER a produkci ATP. V případě hypoxie je narušena tvorba disulfidických můstků v lumen ER. Toto vyústí v akumulaci nesbalených proteinů v ER a stresu. Je aktivován UPR.

Hypoxie v tkáni nádoru vyvolává akumulaci transkripčního faktoru HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). Tento faktor je za normálních podmínek označen ubiquitinací a degradován (Salceda a Caro, 1997). Za hypoxických podmínek zajišťuje přežití buněk a navození homeostázy. HIF-1 reguluje expresi mnoha genů potřebných pro angiogenezi,

nádorovou proliferaci, energetický metabolismus, odolnost proti chemoterapii atd. Zajišťuje také přechod na anaerobní metabolismus glukózy - reguluje expresi glukózových transportérů a glykolytických enzymů. HIF-1 aktivuje transkripci genů pro glukózové transportéry. Glukóza je metabolizována na pyruvát a dále na laktát, který je odváděn z buňky. Extracelulární acidita způsobuje větší invazi zhoubných buněk (Martinez-Zaguilan et al., 1996), metastázy (Schlappack et al., 1991), degradaci extracelulární matrix (Kato et al., 1992) a mutace v transkripčním faktoru p53 (Williams et al., 1999). HIF-1 snižuje tvorbu ROS (reactive oxygen species), které vznikají v důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem (Kirito et al., 2009).

Charakteristickým rysem nádorových buněk je specifická vaskularizace. Nádorové buňky produkují proangiogenní faktory, které zajišťují vznik nových cév. Nově vzniklé i původní cévy mají některé abnormality. Jsou nepravidelné, zkoroucené, nemají inervaci ani hladké svalstvo (Brown a Giaccia, 1998). Krev v nádorových tkáních proto proudí pomalu, nepravidelně.

Koncentrace kyslíku a dynamika krevního toku v nádorech značně kolísá v řádu minut (Brurberg et al., 2005; Lanzen et al., 2006). Některé populace maligních buněk tyto změny oxygenace nevydrží a spustí p53-zprostředkovanou apoptózu (Graeber et al., 1996). Buňky, které přežijí, se adaptují na stres, jsou odolné a způsobují metastázy (Koshikawa et al., 2005). Fakt, že některé buňky přežijí protinádorovou léčbu může být také způsoben, tím, že leží dál od cév a nejsou vystaveny takové koncentraci léčiv jako buňky ležící blízko cévního řečiště (Galmarini et al., 2000). Nádorové buňky jsou narozdíl od buněk normálních neustále vystaveny stresu, což vytváří prostor pro specifickou nádorovou léčbu. Výjimkou jsou B-buňky produkující protilátky a pankreatické buňky sekretující inzulin, pro které by mohla být léčba toxická.

6 ER stres a nádorové buňky

UPR je aktivován u různých druhů nádorů. Jeho aktivace je pro vývoj a přežití nádoru v nepříznivých podmínkách kritická. UPR hraje roli i při metastázování. Předmětem zájmu ve vývoji protinádorových látek je proto blokování UPR nebo jeho přetížení a tím indukce buněčné smrti. Blokováním UPR by byly zasažené převážně buňky nádorové. A to jak buňky, které jsou vystaveny nepříznivým podmínkám a UPR aktivují kvůli hypoxii a nedostatku živin, tak ty, které jsou již vystaveny chemoterapeutikám (Gray et al., 2005).

V této kapitole uvádím tři molekuly UPR v kontextu nádorových buněk – GRP78, IRE1 a PERK. Tyto molekuly jsou možným cílem protinádorových léčiv. Zatím nejnadějnějším z této trojice je GRP78, jehož inhibitory se zdají být velmi účinné. Vhodné inhibitory IRE1 a PERK ještě nebyly nalezeny, ale jejich blokáce by také byla možným cílem protinádorové léčby.

6.1 Hlavní molekuly UPR v kontextu nádorových buněk

6.1.1 BiP/GRP78

GRP78 je chaperon z rodiny HSP70, napomáhající správnému balení proteinů. Váže Ca^{2+} a tím udržuje v ER Ca^{2+} homeostázu. Exprese GRP78 je indukována fyziologickým stresem, který naruší homeostázu v ER. Transkripce genu GRP78 je viditelná už na úrovni dvoubuněčného stadia vznikajícího embrya, kde je zodpovědná za proliferaci vnitřní buněčné masy. Je také silně transkribován v embryotickém srdci, které využívá jako hlavní zdroj energie glukózu (Mao et al., 2006). Většina GRP78 je lokalizována v lumen ER, část však existuje jako transmembránový protein s N-koncovou doménou čnící do cytosolu. Na cytosolickou doménu váže proapoptotické efekторы jako je kaspáza 7 (Reddy et al., 2003) a kaspáza 4 (Jiang et al., 2007) a tím inhibuje jejich aktivaci. Váže také proapoptotický protein Bik a Bax, čímž brání vylití cytochromu c z mitochondrií a zahájení apoptózy (Ranganathan et al., 2006; Fu et al., 2007).

Exprese GRP78 je v hlavních orgánech jako jsou plíce, mozek nebo srdce udržována na stálé nízké hladině. U mnoha typů nádorů jako např. prostaty, prsu, žaludku byla zjištěna mnohem vyšší hladina GRP78 oproti normálním tkáním (Fernandez et al., 2000; Li a Lee, 2006; Lee, 2007). Tyto buňky jsou vystavované jakémusi chronickému ER stresu a můžou být specifickým cílem chemoterapie. Bylo pozorováno, že potlačení GRP78 u buněk fibrosarkomu vede ke snížené schopnosti tvořit nádor (Jamora et al., 1996). GRP78 také hraje roli při zvyšování buněčné proliferace (Pyrko et al., 2007a). Zvýšená hladina GRP78 byla pozorována i v metastatických buněčných liniích (Fu a Lee, 2006; Zhang et al., 2006; Misra et al., 2006).

Ochranný účinek UPR nemá neomezenou kapacitu. Pokud je systém přetížen, je spuštěna apoptóza navzdory vysoké hladině GRP78. Důležitý faktor v této přeměně je transkripční faktor CHOP. V normální buňce je CHOP exprimován málo, v poškozených buňkách naopak velmi silně. Při nestresových podmínkách je přítomen v cytosolu a při stresu

se akumuluje v jádře (Ron a Habener, 1992). CHOP je také indukován při nedostatku glukózy nebo aminokyselin.

CHOP suprimuje Bcl-2, stimuluje receptor smrti 5, aktivuje kaspázy a mitochondriální dráhy, které zesilují apoptotickou kaskádu (Oyadomari a Mori, 2004). V nádorových buňkách je exprese CHOP potlačena GRP78. Při narůstajícím stresu je stimulována exprese CHOP. Míra a trvání zvýšené hladiny CHOP rozhodne, zda buňka zvládne se stresem bojovat, nebo zda nastoupí apoptotická dráha (Rutkowski et al., 2006).

Blokování GRP78 je využíváno pro likvidaci nádorových buněk a bude rozebráno podrobněji v poslední kapitole. Pomocí cytotoxických agens lze zacílit i na GRP78 vyskytující se na buněčném povrchu (Arap et al., 2004; Kim et al., 2006).

6.1.2 IRE1/XBP1

Během ER stresu je aktivována endonukleázová aktivita IRE1 a dochází ke štěpení mRNA pro XBP1. Transkripční faktor XBP1 potom reguluje další geny UPR. Bylo zjištěno, že během hypoxie jsou geny pro UPR indukovány mnohem silněji, a to včetně genů řízených XBP1. Úbytek XBP1 je spojen s vyšší citlivostí nádorových buněk k hypoxii a výrazně brání růstu nádoru (Romero-Ramirez et al., 2004).

Při růstu nádoru musí docházet k neovaskularizaci, která je indukována proangiogenním proteinem VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) (Ferrara et al., 2003). IRE1 je klíčovým regulátorem pro expresi VEGF-A při hypoxii a hypoglykémii. IRE1 se také podílí na růstu nádoru a angiogenezi *in vivo* (Drogat et al., 2007).

6.1.3 PERK

PERK kináza je důležitá pro přežití za hypoxických podmínek. Na modelu myších embryonálních fibroblastů a lidských buněk nádoru střeva bylo prokázáno, že PERK-negativní buňky vykazovaly menší schopnost přežít za hypoxických podmínek, nádory rostly pomaleji a častěji se vyskytovala apoptóza (Koumenis et al., 2002; Bi et al., 2005). Existuje také funkční spojení mezi aktivací PERK/eIF2/ATF4 dráhy a zvýšenou transkripcí proangiogenního faktoru VEGF-A (Bi et al., 2005). Některé studie ukazují, že PERK může také napomáhat supresi nádorových buněk (Sequiera et al., 2007; Brewer et al., 1999; Donze et al., 2004; Perkins a Barber, 2004). Dráha PERK-eIF2 α se podílí na dormanci nádorových buněk (Ranganathan et al., 2006), která vede k chemorezistenci.

7 ER stres a jeho využití při nádorové léčbě

V předchozí kapitole byl zmíněn význam molekul UPR pro nádorové buňky. Tyto molekuly je možné využít k napadení UPR dráhy a indukci apoptózy. Nejlépe prozkoumán je zatím GRP78. Tato kapitola je zaměřená na možnosti léčby, které jsou už v intenzivním výzkumu, některé z nich jsou i v klinických testech. Jsou zde dvě hlavní skupiny léčiv. Látky jako inhibitory proteasomu, inhibitory chaperonu HSP90, brefeldin A a další svým účinkem zvyšují ER stres v buňce. Brání odbourávání chybných proteinů, blokují skládání proteinů, inhibují proteázy a brání vezikulárnímu transportu. Další skupinou jsou látky, které inhibují určitou molekulu, která je součástí UPR dráhy a tím blokují ER stresovou odpověď. To jsou například inhibitory GRP78.

7.1 Látky vyvolávající ER stres

7.1.1 Inhibitory proteasomu 26S

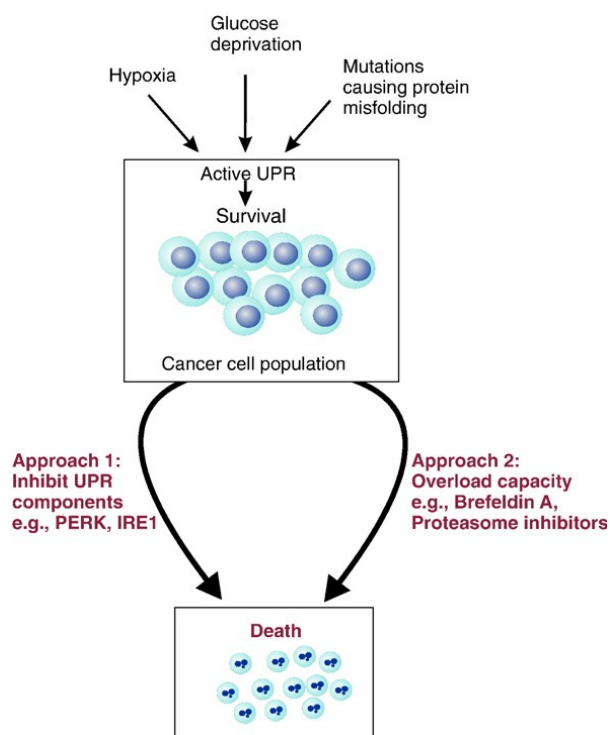
Proteasomy 26S jsou zodpovědné za degradaci proteinů v buňce. Pokud je jejich funkce narušena, hromadí se nepotřebné a chybně sbalené proteiny v buňce, což vyústí v ER stres. V klinickém výzkumu je již inhibitor proteasomu bortezomib, neboli PS-341 (Russo et al., 2010). Oproti jiným inhibitorům proteasomů, bortezomib blokuje specificky pouze 26S proteasom. Bylo prokázáno, že indukuje apoptózu u několika druhů nádoru jako jsou mnohočetné myelomy, nádory prostaty, prsu a vaječníků či karcinomy kůže (Green et al., 2009; Brüning et al., 2009a; Cresta et al., 2008; Lorch et al., 2007).

Bortezomib aktivuje ER stres a indukuje členy proapoptotické části UPR jako PERK, ATF4 a CHOP (Obeng et al., 2006). Přestože bortezomib indukuje ER stres sám o sobě i za normoxických podmínek, mnohem lépe účinkuje u hypoxických nádorových buněk. I hypoxické buňky, které odolávají toxickým agens jsou k bortezomibu vysoce citlivé, protože dohromady zesilují UPR již aktivovaný při hypoxii (Fels et al., 2008).

Kromě jeho role při degradaci reguluje proteasom 26S aktivitu transkripčního faktoru NF- κ B (nuclear factor-kappa B). NF- κ B je normálně blokován inhibitorem, při buněčném stresu je však tento inhibitor označen ubiquitinací a degradován v proteasomu 26S. NF- κ B se tak aktivuje a spouští expresi proteinů důležitých pro přežití buňky a proliferaci. Aktivace NF- κ B tedy snižuje účinnost chemoterapie a ozařování (Wang a Cusack, 1999). Bortezomib brání odbourání inhibitoru NF- κ B a tím jeho aktivaci.

Bortezomib se testuje také v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky pro zesílení jejich účinku. Zvyšuje citlivost pankreatických buněk k ER-stresem vyvolané apoptóze. Zesiluje apoptózu vyvolanou induktory ER stresu, jako je tunicamycin, aktivací JNK kinázy. I při podávání s cisplatinem dochází k zesílení aktivace JNK a apoptózy ve srovnání s podáváním obou látek zvlášť (Nawrocki et al., 2005). Bortezomid v kombinaci s gemcitabinem, který brání replikaci DNA, prodlužuje přežití pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Davies et al., 2009). Po podání antracyklinů lze použít bortezomib s karboplatinou, s využitím v léčbě solidních nádorů (Ma et al., 2007).

Bylo dokázáno, že bortezomib zvyšuje citlivost lymfomů a mnohočetných myelomů k chemoterapeutikům poškozující DNA (Dunleavy et al., 2009; Mitsiades et al., 2003). V buňkách mnohočetných myelomů lze bortezomib využít také v kombinaci s rekombinantní formou smrtelného ligandu TRAIL (TRAIL.0). Bortezomib spolu s TRAIL indukují apoptózu u buněk citlivých k TRAIL (Balsas et al., 2009).



**Obr. 5: Možnosti zacílení
protinádorové terapie na UPR**

(Převzato z Healy et al., 2009)

Přežití hodně typů nádorů je závislých na aktivaci UPR, protože se často vyskytují v nepříznivých podmínkách. Protinádorová terapie se snaží přepnout z drah UPR na dráhy smrtelné.

7.1.2 Inhibitory chaperonu HSP90

HSP90 je chaperon, který hraje důležitou roli při vzniku rakoviny. Velké množství proteinů, kterým pomáhá zaujmout konformaci jsou totiž zásadní pro onkogenezi a vznik maligních nádorů (Xu et al., 2001; Basso et al., 2002; Blagoslonny et al., 1995). Rakovinné

buňky jsou tedy na HSP90 silně závislé, tím více, že se vyskytují v podmínkách hypoxie či nedostatku živin. Proto se tento chaperon zdá být dobrým cílem protinádorových léčiv. HSP90 je důležitý také pro udržování terciární struktury proteasomu 26S a je zřejmě zodpovědný za jeho ATPázovou aktivitu. Jeho inhibice tedy ovlivňuje i degradaci proteinů a jejich hromadění v buňce.

HSP90 v nádorových buňkách existuje hlavně jako multichaperonový komplex s velkou afinitou k ATP, zatímco u buněk normálních je převážně v pasivním stavu a netvoří komplexy (Kamal et al., 2003). Inhibitory HSP90 vyvolávají destabilizaci a později degradaci jeho tzv. client proteinů – proteinů, kterým pomáhá se sbalit (An et al., 2000; Mimnaugh et al., 1996; Schulte et al., 1997). Tím jsou nádorové buňky zabíjeny, a to navíc selektivně, protože HSP90 je u nich exprimován mnohem více než u buněk normálních (Chiosis a Neckers, 2006).

První objevenou a studovanou třídou přirozených inhibitorů HSP90 byly benzoquinonové ansamyciny. Do této třídy patří antibiotikum geldanamycin (GA), izolované ze *Streptomyces hygroscopicus* (DeBoer et al., 1970). Geldanamycin se váže na N-terminální konec ATP-vazebného místa HSP90 a brání navázání client proteinů. Klinický vývoj GA však brzdí jeho vysoká hepatotoxicita a špatná rozpustnost ve vodním prostředí (Ge et al., 2006). Dále byly vyvinuty deriváty GA jako 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) a 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), které jsou již v klinických testech (Kummar et al., 2010; Banerji et al., 2005). Toxicita 17-AAG je menší než GA, rozpustnost je ale podobná (Chiosis et al., 2003).

Rozpustnost 17-DMAG je výrazně lepší než u GA a 17-AAG (Tian et al., 2004). 17-DMAG také vykazuje menší toxicitu a je stabilnější než 17-AAG (Hollingshead et al., 2005). Kvůli své rozpustnosti se 17-DMAG lépe šíří a je zde risk nespecifické toxicity. Tento problém by mohl být vyřešen pomocí micelárního rozváděcího systému. Nadějnou vyhlídku mají tzv. mPEG-b-PCL micely (methoxy-capped poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) micelles). Tento systém je velmi účinný v rozpuštění lipofilního proléčiva 17'-GAC₁₆Br (Forrest et al., 2006). Toto proléčivo je postupně uvolňováno z micel a hydrolyzováno na účinný 17'-GAOH (Forrest et al., 2006). Léčivo podávané v této formě je mnohem lépe snášeno než samotný 17-DMAG (Xiong et al., 2008). Testován byl také systém pro rozvádění 17-AAG s využitím PEO-b-PDLLA micel(poly(ethylene oxide)-b-poly(D,L-lactide)). Zabudováním 17-AAG do těchto micel se zvýší rozpustnost, a to bez nutnosti přidávat další toxické látky jako je například ethanol (Xiong et al., 2009).

Dalším antibiotikem, které inhibuje HSP90 je radicicol. Působí stejně jako GA, váže se na N-terminální konec ATP místa HSP90 a destabilizuje jeho client proteiny (Roe et al., 1999). Radicicol vykazuje protinádorovou aktivitu pouze *in vitro* (Kwon et al., 1997). Proto byly vyvinuty deriváty radicicolu s větší stabilitou a účinností *in vivo* (Proisy et al., 2006). Jedním z těchto derivátů je cycloproparadicicol, který má v preklinických testech protinádorovou aktivitu a menší toxicitu (Yamamoto et al., 2003).

Inhibovat HSP90 vazbou do ATP místa lze také malými syntetickými molekulami jako je PU3 (Chiosis et al., 2006). Výhodou tohoto inhibitoru je necitlivost k multi drug rezistanci (Rodina et al., 2007), metabolická stabilita a dobrá rozpustnost ve vodě (Kasibhatla et al., 2007; He et al., 2006).

HSP90 lze dále inhibovat například narušením jeho interakcí s kochaperony nebo zásahem do jeho posttranslačních modifikací.

7.1.3 Brefeldin A

Brefeldin A (BFA) je sloučenina izolovaná z *Penicillium brefeldianum*, která v savcích buňkách inhibuje vezikulární transport proteinů z ER do Golgi. BFA inhibuje ARF (ADP ribosylation factor). ARF jsou proteiny, které ve své aktivní formě tvoří proteinové komplexy vybírající nákladové proteiny do váčků mířících do Golgi. Tvoří také lešení podporující pučení nových váčků z membrány. Zabráněním ER-Golgi transportu BFA způsobí, že se proteiny hromadí v ER. Je spuštěn UPR, kolaps Golgiho aparátu a je aktivována kaspáza 2 (Carew et al., 2006). BFA také narušuje Golgiho aparát, což způsobuje, že se proteiny vrací zpět do ER.

Již dříve bylo zjištěno, že BFA spouští apoptózu u HeLA buněk, Jurkat, buněk rakoviny prostaty, colonu, mnohočetného myelomu a adenoid cystic sarcoma (Wallen et al., 2000; Salles et al., 2004; Boya et al., 2002; Guo et al., 1998, Shao et al., 2006). BFA také velmi účinně indukuje apoptózu u buněk folikulárního lymfomu. Efekt byl ještě zesílen v kombinaci s HA14-1 (malý Bcl-2 inhibitor) a anti-FasAb (anti-Fas monoclonal antibody, spouštěč smrtelné dráhy) (Wlodkowic et al., 2007). BFA je využíván pro likvidaci maligních B-lymfocytů při chronické lymfoidní leukémii (CLL). Buňky maligních B-lymfocytů mají více vyvinutou síť ER v porovnání s normálními buňkami, což je zřejmě nezbytné pro přežití těchto kmenů. BFA také pomáhá v buňkách CLL, které odolávají chemoterapeutiku fludarabinu (Carew et al., 2006).

Na BFA je citlivý virus HPV19 (Human papillomavirus type 16), způsobující rakovinu děložního čípku. BFA zabraňuje cestování COPI váčků s virem HPV16 do ER a tím brání šíření infekce (Laniosz et al., 2009).

Kvůli nedostatkům BFA, jako je špatná rozpustnost v biologických roztocích nebo neurotoxicitě při studiích na zvířatech (Kikuchi et al., 2003), jsou vyvíjeny deriváty a analogy BFA s lepšími vlastnostmi. Jde například o esterové deriváty (Anadu et al., 2006) nebo sulfidové deriváty využitelné jako proléčiva (Fox et al., 2001).

7.1.4 Tetrocarcin-A

Tetrocarcin-A (TC-A) je antibiotikum a protinádorové agens izolované z aktinomycety *Micromonospora*. Na T-buňkách akutní lymfoblastické leukémie bylo prokázáno, že spouští apoptotickou dráhu skrze štěpení Bax a Bid, ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz. Tato dráha byla nezávislá na expresi Bcl-2 a aktivaci kaspázy 8. Navíc je při ní aktivována kaspáza 12, typická pro smrtelné dráhy spojené se stresem ER. V těchto buňkách byla také zjištěno zvýšené množství chaperonů, jako je HSP70, což naznačuje, že funkce ER byla narušena (Tinhofer et al., 2002). Tyto účinky měl TC-A i na buňky B lymfocytární chronické lymfoidní leukémie (Anether et al., 2003). TC-A také spouští apoptózu u buněk nádoru prsu (Nakajima et al., 2007).

7.1.5 Ritonavir a nelfinavir

Ritonavir je inhibitor HIV proteázy používaný k léčbě retrovirových infekcí, především infekcí virem HIV. Ritonavir také blokuje jaterní a střevní enzym, který metabolizuje další inhibitory proteáz a tím se množství inhibitorů zvyšuje (Moyle et al., 1998). Inhibicí proteáz v buňce se snižuje degradace nepotřebných proteinů a ty se hromadí. Ritonavir se využívá k posílení účinku bortezomidu v léčbě solidních nádorů. Solidní nádory narozdíl například od myelomů nejsou k bortezomidu příliš citlivé, protože nejsou tak často pod ER stresem. Kombinace těchto dvou agens výrazně zvyšuje ER stres a účinnost léčby (Kraus et al., 2008).

Nelfinavir je další inhibitor HIV proteázy. Nelfinavir je také schopný indukovat ER stres u nádorových buněk (Pyrko et al., 2007b), mechanismus ale pořád zůstává nejasný. Například u buněk nádoru vaječníků vyvolal nelfinavir pleiotropní efekt v podobě apoptózy, nekrózy i ER stresu. To je výhodou oproti jiným protinádorovým léčivům, protože snižuje pravděpodobnost, že si buňky vytvoří rezistenci (Brüning et al., 2009b).

7.1.6 Kurkumin

Kurkumin (diferuloylmethane) je žlutý pigment pocházející z rostlin čeledi zázvorovitých. Vedle jeho mnoha příznivých účinků na organismus má také protinádorové účinky, zmapované v mnoha člancích pro různé druhy rakovin. Kurkumin potlačuje transformaci, proliferaci a metastázování nádorových buněk (Bharti et al., 2003; Menon et al., 1999). Selektivně zabíjí nádorové buňky a pro normální buňky je netoxický (Choudhuri et al., 2005; Holy, 2002). Má také preventivní účinky pro vznik rakoviny (Inano et al., 2000). Inhibuje rozvoj rakoviny v několika místech dráhy rozvoje malignity. Potlačuje například aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který je zodpovědný za indukci exprese genů důležitých pro buněčnou transformaci, chemorezistenci, metastázování apod (Singh et al., 1995). Tento transkripční faktor je zodpovědný za regulaci antiapoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L (Sandur et al., 2007). Kurkumin skrze NF- κ B potlačuje expresi Bcl-2 a Bcl-X_L u buněk mnohočetných myelomů a mantle cell lymfomů (Shishodia et al., 2005).

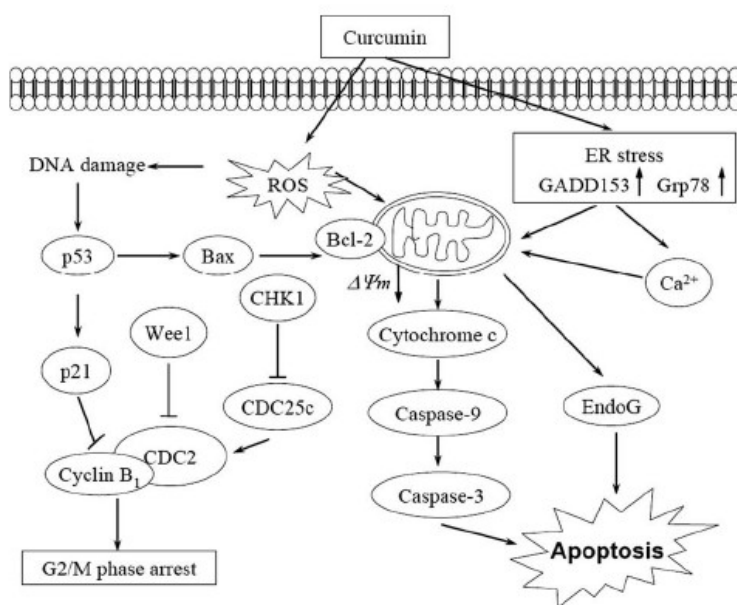
Kurkumin vyvolává apoptózu u různých buněčných linií, například u buněk akutní a chronické myelogenní leukemie, rakoviny prsu, prostaty a děložního čípku (Bharti et al., 2003; Deeb et al., 2007; Liu et al., 2009; Xu et al., 2009). Apoptóza je vyvolána skrz mitochondriální dráhu a zahrnuje štěpení Bid, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspázy 3. Přesný mechanismus vyvolání apoptózy však ještě nebyl rozluštěn. Zdá se ale, že ER stres je zásadním pro spuštění apoptózy.

Kurkumin vyvolal ER stres u lidských buněk leukémie. Došlo ke zvýšené expresi GRP78 a CHOP, fosforylaci PERK a eIF2 α a ke štěpení prokaspázy 4. Inhibice CHOP a zabránění aktivaci kaspázy 4 výrazně snížila apoptózu způsobenou kurkuminem (Pae et al., 2007). Protože nedošlo k úplnému zamezení spuštění apoptózy, předpokládá se, že se účastní i další dráhy spojené s dysfunkcí mitochondrií (Karmakar et al., 2006).

U buněk myšího melanomu vyvolal kurkumin také expresi CHOP, fosforylaci eIF2 α a aktivaci kaspázy 12 a 7 (Bakhshi et al., 2008). U buněk karcinomu plic bylo pozorováno, že kurkumin způsobuje poškození DNA, produkci ROS a vyvolává ER stres, což je vidět na zvýšené produkci genů pro GRP78 a CHOP. Vyvolává pokles mitochondriálního membránového potenciálu, způsobuje vylití cytochromu c, nárůst Bax, pokles Bcl-2 a aktivaci kaspázy 3, což vyústí v apoptózu. Vyvolává také zadržení buněčného cyklu v G2/M fázi (Lin et al., 2008).

Kurkumin inhibuje aktivitu proteasomů a způsobuje hromadění ubiquitinovaných proteinů v buňce. Ukázalo se, že kurkumin inhibuje aktivitu ubiquitinových izopeptidáz, které

zajišťují opakované využití ubiquitinu (Mullally a Fitzpatrick, 2002). Inhibice těchto izopeptidáz způsobí hromadění komplexů ubiquitin-protein a polyubiquitin. Tyto komplexy by mohly způsobovat dysfunkci proteasomu. Další možnou příčinou je oxidační stres, způsobený kurkuminem (Bhaumik et al., 1999).



Obr. 6: Model účinku kurkuminu

(Převzato z Lin et al., 2008)

Kurkumin indukuje vznik ROS. Dochází k poškození DNA a aktivaci p53, což vyústí v zadržení buněčného cyklu v G2/M fázi. ROS indukují ER stres, nárůst GADD153 (neboli CHOP) a GRP78 a spuštění apoptotické dráhy

7.2 Inhibitory ER stresové odpovědi

7.2.1 Inhibitory BiP/GRP78

Chaperon BiP/GRP78 je pro přežití buněk ve stresu zásadní a jak už bylo zmíněno, je v rakovinových buňkách vysoce exprimován. S přirozenými inhibitory GRP78 se setkáváme i v běžném životě. Patří mezi ně například genistein obsažený v sóje, EGCG (epigallocatechin gallate) v zeleném čaji nebo kyselina salicylová vyskytující se v rostlinách. Tyto inhibitory jsou ale málo specifické.

Velmi specifickou látkou inhibující GRP78 je bakteriální AB₅ subtilázový cytotoxin (SubAB). Podjednotka A tohoto toxinu má serin proteázovou aktivitu. Štěpí GRP78 v jednom

určité místě a tím ho inaktivuje. Záměna jednoho nukleotidu v místě štěpení způsobí, že GRP78 je ke štěpení rezistentní (Paton et al., 2006).

GRP78 je také intracelulárním cílem produktu genu MDA-7/IL-24 (melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24). MDA-7/IL-24 vyvolává zastavení růstu nádorových buněk a apoptózu, zatímco na normální buňky nemá negativní vliv. Primární místo lokalizace MDA-7/IL-24 je ER a Golgi. GRP78 interaguje s MDA-7/IL-24, což vyvolá fosforylaci p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) a následně indukci GADD genů (Gupta et al., 2006). Tím je spuštěna apoptóza, a to selektivně pouze u nádorových buněk (Su et al., 2003). Ještě není objasněno, proč se takto nespouští apoptóza i u normálních buněk.

Dalším inhibitorem GRP78 je versipelostatin, který byl izolován ze *Streptomyces versipellis*. Versipelostatin narušuje UPR u buněk trpících nedostatkem glukózy (Park et al., 2004). Snižuje produkci GRP78 a dále produkci ATF4, transkripčního faktoru genů UPR. Ovlivění těchto produktů se děje skrz iniciační faktor 4E-BP1 (4E-binding protein 1). 4E-BP1 je aktivován versipelostatinem specificky během nedostatku glukózy (Matsuo et al., 2009). Versipelostatin lze kombinovat s podáváním cisplatinu, chemoterapeutikem způsobující zesíťování DNA a apoptózu (Park et al., 2004).

U nádorových buněk se GRP78 vyskytuje i na buněčném povrchu (Arap et al., 2004). U většiny normálních buněk se zde nevyskytuje, ale byl nalezen na povrchu monocytů a dělicích se endoteliálních buněk (Bhattacharjee et al., 2005; Davidson et al., 2005). Tato překážka brzdí využití GRP78 receptorů v protinádorové léčbě. U nádorových buněk se ale GRP78 přece jen odlišuje specifickými posttranskripčními modifikacemi (Rauschert et al., 2008). Díky těmto modifikacím jsou také rozeznávány imunitním systémem (Brandlein et al., 2003). Nádorové buňky mají na povrchu jak normální GRP78, běžné u různých typů buněk, tak modifikované. Monoklonální IgM protilátka SAM-6 rozeznává jednu z izoform GRP78 – tzv. GRP78^{SAM-6}. Tato izoforma je specifická pro nádorové buňky a normální buňky ji postrádají. GRP78^{SAM-6} izoforma má posttranskripční modifikace typické pro povrchovou formu GRP78 a nenachází se u intracelulárních GRP78 (Rauschert et al., 2008). Maligní buňky léčené SAM-6 protilátkou akumulují letální množství cholesterolu a triglyceridových esterů. Toto hromadění lipidů je nádorově specifické a vyústí v apoptózu (Pohle et al., 2004). GRP78 na buněčném povrchu lze využít nejen k cílenému vyřazování jeho funkce, ale i jako nádorový marker.

8 Závěr

Apoptóza indukovaná stresem ER je účinnou zbraní k likvidaci nádorových buněk. Ve výzkumu je mnoho látek, které využívají tohoto mechanismu. Léčiva zaměřená na stres ER fungují u různých typů nádorů a některá jsou již v klinických testech. Jejich největším kladem je specifita k nádorovým buňkám. Zaměření léčiv na molekulární mechanismy uplatňující se v nádorových buňkách umožňuje jejich přesnější likvidaci a menší toxicitu pro zdravé tkáně. Tyto látky účinkují jak samostatně, tak v kombinaci s používanými chemoterapeutiky, čímž je dosaženo menších vedlejších účinků. U látek s příliš vysokou toxicitou či nevyhovujícími vlastnostmi je snaha vyvíjet deriváty s lepšími vlastnostmi a podobným účinkem.

I když jsme schopni úspěšně využít mechanismů ER stresu, je třeba nadále studovat a zdokonalovat způsoby odstraňování nádorových buněk. Prostor pro další výzkum je například v oblasti nalezení vhodných inhibitorů IRE1 a PERK. Je pravděpodobné, že léčebné postupy využívající ER stresu budou hrát důležitou roli při léčbě rakoviny a pacienti díky ní budou léčeni účinněji a šetrněji než dosud.

9 Seznam použité literatury

- An WG, Schulte TW, Neckers LM (2000)** The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome. *Cell Growth Differ.* 11: 355–360
- Anadu NO, Davisson VJ, Cushman M (2006)** Synthesis and Anticancer Activity of Brefeldin A Ester Derivatives. *J. Med. Chem.* 49: 3897-3905
- Anether G, Tinhofer I, Senfter M, Greil R (2002)** Tetrocarcin-A–induced ER stress mediates apoptosis in B-CLL cells via a Bcl-2–independent pathway. *Blood* 11: 4561-4568
- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R (2004)** Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cells* 6: 275–284
- Ashkenazi A (2002)** Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2: 420–430
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998)** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305–8.
- Balsas P, Lo’pez-Royuela N, Gala’n-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J (2009)** Cooperation between Apo2L/ TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochemical pharmacology* 77: 804 – 812
- Banerji U, O’Donnell A, Scurr M, Pacey S, Stapleton S et al. (2005)** Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 23: 4152-416
- Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2004)** Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 23: 1207–1216
- Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N (2002)** Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21: 1159–1166
- Bakhshi J, Weinstein L, Poksay KS, Nishinaga B, Bredesen DE, Rao RV (2008)** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis* 13: 904-14
- Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB (2003)** Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa- Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 101:1053-62
- Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, et al. (2005)** Regulation of tissue factor—mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1737–1743
- Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Khar A. (1999)** Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett.* 456: 311-4
- Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, Harding H, Novoa I, Varia M, Raleigh J, Scheuner D, Kaufman RJ, Bell J, Ron D, Wouters BG, Koumenis C (2005)** ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24: 3470–3481
- Blagosklonny MV, Toretsky J, Neckers L (1995)** Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene* 11: 933–939
- Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL, Kroemer G (2002)** Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* 9: 465–467

Boyce M Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma DW, Coen DM, Ron D, Yuan JY (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307: 935–939

Brandlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2003) Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res.* 63:7995–8005

Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 8505–8510

Brown JM, Giaccia AJ (1998) The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 58: 1408–1416

Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Friese K, Lenhard M, Burges A (2009 a) Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. *Invest. New Drugs* 27: 543–551

Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Ginkelmaier A, Friese K, Lenhard M, Burges A (2009 b) Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis. *Cancer Biology & Therapy* 8: 226-232

Brurberg KG, Skogmo HK, Graff BA, Olsen DR, Rofstad EK (2005) Fluctuations in pO₂ in poorly and well-oxygenated spontaneous canine tumors before and during fractionated radiation therapy. *Radiotherapy and Oncology* 77: 220-6

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell Biol.* 23: 1292–1303

Cain K, Bratton SB and Cohen GM (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochemie* 84: 203-214

Carew JS, Nawrocki ST, Krupnik YV, Dunner K, McConkey DJ, Keating MJ, et al. (2006) Targeting endoplasmic reticulum protein transport: a novel strategy to kill malignant B cells and overcome fludarabine resistance in CLL. *Blood* 107: 222–31

Chae HJ, Kim HR, Xu C et al. (2004) BI-1 Regulates an Apoptosis Pathway Linked to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Cell* 15: 355–366

Chiosis G, Neckers L (2006) Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chem. Biol.* 1: 279–284

Chiosis G, Huezo H, Rosen N, Mimnaugh E, Whitesell L, Neckers L (2003) 17AAG: low target binding affinity and potent cell activity-- finding an explanation. *Mol. Cancer Ther.* 2: 131-8

Chiosis G (2006) Discovery and development of purine-scaffold Hsp90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 1183–1191

Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G (2005) Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 280: 20059–20068

Cresta S, Sessa C, Catapano CV, Gallerani E, Passalacqua D et al. (2008) Phase I study of bortezomib with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumours. *European Journal of Cancer* 44:1829-1834

Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. (2005) Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res.* 65: 4663–4672

Davies AM, Chansky K, Lara PN, Gumerlock PH et al. (2009) Bortezomib Plus Gemcitabine/Carboplatin as First-Line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer A Phase II Southwest Oncology Group Study (S0339). *Journal of Thoracic* 4: 87-92

DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH (1970) Geldanamycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 23: 442-447

Deeb D, Jiang H, Gao X, Al-Holou S, Danyluk AL, Dulchavsky SA and Gautam SC (2007) Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3,5-dione; C₂₁H₂₀O₆] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor-kappaB via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321: 616-625

Donze O, Deng J, Curran J, Sladek R, Picard D, Sonenberg N (2004) The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. *EMBO J.* 23: 564-571

Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouchecareilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A and Moenner M (2007) IRE1 Signaling Is Essential for Ischemia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression and Contributes to Angiogenesis and Tumor Growth In vivo. *Cancer Res.* 67:6700-7

Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42

Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave S, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH (2009) Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Blood* 113: 6069-6076

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286: 1882-1888

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495-516

Fels DR, Ye J, Segan AT, Kridel SJ, Spiotto M, Olson M, Koong AC, Koumenis C (2008) Preferential Cytotoxicity of Bortezomib toward Hypoxic Tumor Cells via Overactivation of Endoplasmic Reticulum Stress Pathways. *Cancer Res.* 68: 9323-30

Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, Kennedy KA, Patierno SR (2000) Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* 59: 15-26

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9: 669-76

Fischer H, Koenig U, Eckhart L and Tschachler E (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 722-726

Forrest ML, Zhao A, Won CY, Malick AW, Kwon GS (2006) Lipophilic prodrugs of Hsp90 inhibitor geldanamycin for nanoencapsulation in poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) micelles. *J. Control. Release* 116:139-49

Fox BM, Vroman JA, Fanwick PE, Cushman M (2001) Preparation and Evaluation of Sulfide Derivatives of the Antibiotic Brefeldin A as Potential Prodrug Candidates with Enhanced Aqueous Solubilities. *J. Med. Chem.* 44: 3915-3924

Fu Y, Lee AS (2006) Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol. Ther.* 5: 741-4

Fu Y, Li J, Lee AS (2007) GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen-starvation induced apoptosis. *Cancer Res.* 67: 3734-40

Galmarini FC, Galmarini CM, Sarchi MI, Abulafia J, Galmarini D (2000) Heterogeneous distribution of tumor blood supply affects the response to chemotherapy in patients with head and neck cancer. *Microcirculation* 7: 405–410

Galonek HL and Hardwick JM (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nature Cell Biol.* 8: 1317–1319

Ge J, Normant E, Porter JR, Ali JA, Dembski MS, Gao Y, Georges AT, Grenier L, Pak RH, Patterson J, Sydor JR, Tibbitts TT, Tong JK, Adams J, Palombella VJ (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of hydroquinone derivatives of 17- amino-17-demethoxygeldanamycin as potent, water-soluble inhibitors of Hsp90. *J. Med. Chem.* 49: 4606–4615

Germain M, Mathai JP, McBride HM and Shore GC (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24: 1546-1556

Gillies RJ and Gatenby RA (2007) Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J. Bioenerg. Biomembr.* 39: 251–257

Gray MD, Mann M, Nitiss JL, Hendershot LM (2005) Activation of the unfolded protein response is necessary and sufficient for reducing topoisomerase IIalpha protein levels and decreasing sensitivity to topoisomerase-targeted drugs. *Mol. Pharmacol.* 68: 1699–1707

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379: 88-91

Guo H, Tittle TV, Allen H, Maziarz RT (1998) Brefeldin A-mediated apoptosis requires the activation of caspases and is inhibited by Bcl-2. *Exp. Cell Res.* 245: 57–68

Gupta P, Walter MR, Su ZZ, Lebedeva IV, Emdad L, Randolph A, Valerie K, Sarkar D, Fisher PB (2006) BIP/GRP78 is an intracellular target for MDA-7/IL-24 induction of cancer-specific apoptosis. *Cancer Res.* 66: 8182-8191

Hacker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301: 5–17

Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I and Borner C (2000) Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 19: 2286–2295

Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S and Yi M (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 4: 553-560

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271–274

He H, Zatorska D, Kim J et al. (2006) Identification of potent water soluble purine scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* 49: 381–390

Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A (2009) Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology* 625 :234–246

Herrmann JL, Menter DG, Beham A, von Eschenbach A and McDonnell TJ (1997) Regulation of lipid signaling pathways for cell survival and apoptosis by bcl-2 in prostate carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.*, 234: 442-451

Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y and Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A beta-induced cell death. *J. Cell. Biol.*, 165: 347- 356

Hollingshead M, Alley M, Burger AM et al. (2005) In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56: 115–125

Holy JM (2002) Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat. Res.* 518: 71–84

Inano H, Makoto O, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H and Wakabayashi K (2000) Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 21: 1835–1841

Jamora C, Dennert G, Lee AS (1996) Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 7690–7694

Jarosch E, Lenk U and Sommer T (2003) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int. Rev. Cytol.* 223: 39–81

Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Wang YF, Kiejda KA, Zhang XD and Hersey P (2007) Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67: 9750–9761

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L et al. (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407–410

Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2006) Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci. Lett.* 407: 53–58

Kasibhatla SR, Hong K, Biamonte MA (2007) Rationally designed high-affinity 2-amino-6-halopurine heat shock protein 90 inhibitors that exhibit potent antitumor activity. *J. Med. Chem.* 50: 2767–2778

Kato Y, Nakayama Y, Umeda M, Miyazaki K (1992) Induction of 103-kD agelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 267: 11424–11430

Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110: 1389–1398

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239–257

Kikuchi S, Shinpo K, Tsuji S, Yabe I, Niino M, Tashiro K (2003) Brefeldin A-Induced Neurotoxicity in Cultured Spinal Cord Neurons. *J. Neurosci. Res.* 71: 591–599

Kim Y, Lillo AM, Steiniger SC, Liu Y, Ballatore C, Anichini A, Mortarini R, Kaufmann GF, Zhou B, Felding-Habermann B, Janda KD (2006) Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry* 45: 9434–9444

Kirito K, Hu YZ, Komatsu N (2009) HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* 8: 2844–2849

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 14: 5579–88

Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K (2005) Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* 25: 917–28

Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG (2002) Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation. *Molecular and Cellular Biology* 22: 7405–7416

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332: 462–464

Kraus M, Malenke E, Gogel J, Müller H, Rückrich T, Overkleeft H, Ovaa H, Koscielniak E et al. (2008) Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7: 1940-1948

Kummar S, Gutierrez ME, Gardner RE, Chen X, Figg WD, Zajac-Kaye M et al. (2010) Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer* 46: 340–347

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G et al. (2002) Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 111: 331–342

Kwon HJ, Yoshida M, Nagaoka R, Obinata T, Beppu T and Horinouti S (1997) Suppression of morphological transformation by radicicol is accompanied by enhanced gelsolin expression. *Oncogene* 15: 2625–2631

Laniosz V, Dabydeen SA, Havens MA, Meneses PI (2009) Human papillomavirus type 16 infection of human keratinocytes requires clathrin and caveolin-1 and is brefeldin A sensitive. *J Virol*. 83: 8221-32

Lanzen J, Braun RD, Klitzman B, Brizel D, Secomb TW, Dewhirst MW (2006) Direct demonstration of instabilities in oxygen concentrations within the extravascular compartment of an experimental tumor. *Cancer Res*. 66: 2219-23

Lee AS (2007) GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 67: 3496–3499

Lee GH, Kim HK, Chae SW, Kim DS, Ha KC, Cuddy M, Kress C, Reed JC, Kim HR, Chae HJ (2007) Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem*. 282: 21618-28

Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2432–2437

Li J, Lee AS (2006) Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr. Mol. Med*. 6: 45–54

Li LY, Luo X and Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99

Lin SS, Huang HP, Yang JS, Wu JY, Hsia TC, Lin CC, Lin CW, Kuo CL, Gibson Wood W, Chung JG (2008) DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett*. 272: 77-90

Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y (2009) Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*. 16: 916-22

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487–501

Lorch JH, Thomas TO, Schmoll HJ (2007) Bortezomib inhibits cell-cell adhesion and cell migration and enhances epidermal growth factor receptor inhibitor-induced cell death in squamous cell cancer. *Cancer Research* 67: 727-734

Ma C, Mandrekar SJ, Alberts SR, Croghan GA et al. (2007) A phase I and pharmacologic study of sequences of the proteasome inhibitor, bortezomib (PS-341, Velcade™), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 59: 207–215

Mao C, Tai WC, Bai Y, Poizat C, Lee AS (2006) In vivo regulation of Grp78/BiP transcription in the embryonic heart: role of the endoplasmic reticulum stress response element and GATA-4. *J. Biol. Chem.* 281: 8877–87

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18: 3066–3077

Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ (1996) Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 14: 176–186

Matsuo J, Tsukumo Y, Sakurai J, Tsukahara S, Park HR, Kazuo S, Watanabe T, Tsuruo T, Tomido A (2009) Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-binding protein 1 by versipelostatin. *Cancer Science* 100: 327–333

McBride HM, Neuspiel M and Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16: 551–560

Menon LG, Kuttan R, Kuttan G (1999) Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.* 141:159–65

Micheau O and Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181–190

Mimnaugh EG, Chavany C, Neckers L (1996) Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J. Biol. Chem.* 271: 22796–22801

Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV (2006) Activation and cross-talk between Akt, NF- κ B, and unfolded protein response signaling in L-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J. Biol. Chem.* 281: 13694–707

Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC (2003) The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 101: 2377–2380

Moyle G (1998) The role of combinations of HIV protease inhibitors in the management of persons with HIV infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 7: 413–26

Mullally JE, Fitzpatrick FA (2002) Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death. *Mol. Pharmacol.* 62: 351–8

Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K Jr, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ (2005) Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 65: 11658–66

Nakagawa T and Yuan J (2000) Caspase-12 mediates an ER-specific apoptosis pathway. *J. Cell Biol.* 150: 887–894

Nakajima H, Sakaguchi K, Fujiwara I, Mizuta M, Tsuruga M, Magae J, Mizuta N (2007) Apoptosis and inactivation of the PI3-kinase pathway by tetrocarcin A in breast cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356: 260–265

Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22: 1180–1187

Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ and Swisher SG (2002) Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 277: 9219–9225

- Oakes SA, Lin SS and Bassik MC (2006)** The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr. Mol. Med.* 6: 99–109
- Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ and Scorrano L (2003)** Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Pharm.* 66: 335–1340
- Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH (2006)** Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107: 4907–4916
- Oyadomari S, Mori M (2004)** Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11 381–389
- Pae HO, Jeong SO, Jeong GS, Kim KM, Kim HS, Kim SA, Kim YC, Kang SD, Kim BN, Chung HT (2007)** Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 1040–5
- Pan JG and Mak TW (2007)** Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era? *Sci. STKE* 381, pe14
- Park HR, Tomida A, Sato S, Tsukomo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shin-ya K (2004)** Effect on Tumor Cells of Blocking Survival Response to Glucose Deprivation. *Journal of the National Cancer Institute* 96: 1300–1310
- Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MCJ, Rossjohn J, Talbot UM, Paton JC (2006)** AB(5) subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 443: 548–552
- Perkins DJ, Barber GN (2004)** Defects in translational regulation mediated by the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24: 2025–2040
- Pietenpol JA, Stewart ZA (2002)** Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182: 475–81
- Pohle T, Brandlein S, Ruoff N, et al. (2004)** Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res.* 64: 3900–3906
- Proisy N, Sharp SY, Boxall K et al. (2006)** Inhibition of Hsp90 with synthetic macrolactones: synthesis and structural and biological evaluation of ring and conformational analogs of radicicol. *Chem. Biol.* 13: 1203–1215
- Pyrko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007 a)** The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* 67: 9809–9816
- Pyrko P, Kardosh A, Wang W, Xiong W, Schönthal AH, Chen TC (2007 b)** HIV-1 protease inhibitors nelfinavir and atazanavir induce malignant glioma death by triggering endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 67: 10920–8
- Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA (2006)** Functional coupling of p38-induced upregulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res.* 66: 1702–11
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM and Bredesen DE (2001)** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program - Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* 276: 33869–33874
- Rasheva V, Domingos P (2009)** Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 14: 996–1007
- Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP (2008)** A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Laboratory Investigation* 88: 375–386

- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003)** Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J. Biol. Chem.* 278: 20915–20924
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M and Pozzan T (1993)** Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262: 744–747
- Rodina A, Vilenchik M, Moulick K et al. (2007)** Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* 3: 498–507
- Rodriguez J and Lazebnik Y (1999)** Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13: 3179–3184
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999)** Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* 42: 260–266
- Ron D and Habener JF (1992)** CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6: 439–453
- Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, et al. (2004)** XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* 64: 5943–7
- Rueggsegger U, Leber JH, Walter P (2001)** Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* 107:103–114
- Ruiz-Vela A, Opferman JT, Cheng EH and Korsmeyer SJ (2005)** Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases, *EMBO Rep.* 6: 379–385
- Russo A, Bronte G, Fulfaro F, Cicero G, Adamo V, Gebbia N, Rizzo S (2010)** Bortezomib: A New Pro-Apoptotic Agent in Cancer Treatment. *Current cancer drug targets* 10: 55–67
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ (2006)** Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and proapoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 4: e374
- Salceda S, Caro J (1997)** Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions, Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272: 22642–22647
- Salles FT, Hespanhol AM, Jaeger RG, Marques MM (2004)** Brefeldin-A induces apoptosis in human adenoid cystic carcinoma cultured cells. *Oral Oncol.* 40: 585–590
- Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G and Aggarwal BB (2007)** Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic. Biol. Med.* 43: 568–580
- Savill J, Fadok V (2000)** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784–8
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T and Korsmeyer SJ (2003)** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* 300: 135–139
- Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F and Bernardi P (2001)** Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- α apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 12035–12040
- Schlappack OK, Zimmermann A, Hill RP (1991)** Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *Brit. J. Cancer* 64: 663–670

Schulte TW, An WG, Neckers LM (1997) Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 655–659

Sequeira SJ, Ranganathan AC, Adam AP, Iglesias BV, Farias EF, Aguirre-Ghiso JA (2007) Inhibition of proliferation by PERK regulates mammary acinar morphogenesis and tumor formation. *PLoS ONE* 2: e615

Shao RG, Shimizu T, Pommier Y (1996) Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. *Exp. Cell Res.* 227: 190–6

Shen J et al. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3: 99–111

Shishodia S, Amin HM, Lai R and Aggarwal BB (2005) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem. Pharmacol.* 70: 700–713

Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 γ -subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell Biol.* 18: 7499–7509

Sidrauski C, Cox JS, Walter P (1996) tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 87: 405–413

Singh S, Aggarwal BB (1995) Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270: 24995–5000

Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441–446

Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM. and Longo DL (1999) Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3775–3780

Strasser A, O'Connor L and Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217–245

Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, et al. (2003) Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner. *Oncogene* 22: 1164–80

Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad. Sci.* 1010: 186–194

Tian Z-Q, Liu Y, Zhang D, Wang Z, Dong SD, Carreras CW, Zhou Y, Rastelli G, Santi DV, Myles D C (2004) Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 5317–5329

Tinhofer I, Anether G, Senfter M, Pfaller K, Bernhard D, Hara M, Greil R (2002) Stressful death of T-ALL tumor cells following treatment with the antitumor agent Tetrocarcin-A. *FASEB journal* 16: 1295–7

Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11269–11274

Vieira HLA, Kroemer G (1999) Pathophysiology of mitochondrial cell death control. *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 971–976

Wallen E, Sellers RG, Peehl DM (2000) Brefeldin A induces p53-independent apoptosis in primary cultures of human prostatic cancer cells. *J. Urol.* 164: 836–841

Wang CY, Cusack J, Liu R, Baldwin AS (1999) Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy via increased apoptosis through inhibition of NF- κ B. *Nature Med.* 5: 412–17

Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C (1999) An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18: 3199–3204

Wlodkowic D, Skommer J, Pelkonen J (2007) Brefeldin A triggers apoptosis associated with mitochondrial breach and enhances HA14-1- and anti-Fas-mediated cell killing in follicular lymphoma cells. *Leukemia Research* 31: 1687–1700

Xiong MP, Yáñez JA, Kwon GS, Davies NM, Forrest ML (2009) A Cremophor-Free Formulation for Tanespimycin (17-AAG) Using PEO-b-PDLLA Micelles: Characterization and Pharmacokinetics in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 1577-1586

Xiong MP, Yáñez JA, Remsberg CM, Ohgami Y, Kwon GS, Davies NM, Forrest M (2008) Formulation of a geldanamycin prodrug in mPEG-b-PCL micelles greatly enhances tolerability and pharmacokinetics in rats. *Journal of Controlled Release* 129: 33–40

Xu F, Mu XL, Zhao J (2009) Effects of curcumin on invasion and metastasis in the human cervical cancer cells Caski. *Chinese Journal of Cancer Research* 21;159-162

Xu Q and Reed JC (1998) BAX inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1: 337–346

Xu W et al. (2001) Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J. Biol. Chem.* 276: 3702–3708

Yamamoto K, Garbaccio RM, Stachel SJ et al. (2003) Total synthesis as a resource in the discovery of potentially valuable antitumor agents: cycloproparadicicol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 1280–1284

Yan W, Frank CL, Korth MJ et al. (2002) Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15920–15925

Ye J, Rawson RB, Komuro R et al. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6: 1355–1364

Zamzami N and Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 67-71

Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM and Hannun YA (1996) Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5325-5328

Zhang J, Jiang Y, Jia Z, et al. (2006) Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 23: 401–10

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J and Thompson CB (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162: 59-69

